**Journal of Ardabil University of Medical Sciences**

**Vol. 19, No. 1, Spring 2019, Pages 30-40**

# Drug Resistance Patterns and Genotyping of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients Admitted to Shahrekord Teaching Hospitals Using REP-PCR

Sarafan Sadeghi A[1], Ansari N[2], Khademi F[3], Mir Nejad R[4], Zamanzad B*[5]

1. Department of Nutrition Sciences, Varastegan Institute of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Emam Hosein Hospital, Esfahan University of Medical Sciences, Esfahan, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
4. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Department of Microbiology and Immunology ،School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

****Corresponding Author***. Tel: +983833335653, Fax: +983833349113, E-mail: behnamzamanzad5@gmail.com

Received: Dec 21, 2018 Accepted: Mar 11, 2019

## ABSTRACT

***Background & objectives*:** In recent years, *Acinetobacter baumannii* has been shown to be associated with several nosocomial infections, including pneumonia, bacteraemia, urinary tract infections, wound infection and meningitis. This organism can survive in the hospital environment and rapidly develops resistance to many antibiotics. The molecular genotyping can increase our knowledge about the spread of *A. baumannii* strains from one hospital to another and their drug resistance. Therefore, this study aimed to determine the prevalence of antibiotic resistance profile as well as phylogenetic relationships of *A. baumannii* strains in Shahrekord teaching hospitals.

***Methods*:** In this study, antibacterial susceptibility patterns of *A. baumannii* strains isolated from different clinical specimens (urine, blood, sputum) to amikacin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamycin, imipenem, meropenem, norfloxacin, ofloxacin, piperacillin/tazobactam, tobramycin were tested using disk diffusion (Kirby-Bauer) method. Finally, genotyping of *A. baumannii* strains was performed using REP-PCR method.

***Results*:** During this study, 50 samples of patients were identified as *A. baumannii* (71%), and their drug resistance rates were assessed. All *A. baumannii* strains were resistant to ceftazidime and cefepime and also a high rate of resistance to aztreonam, norfloxacin, ciprofloxacin, amikacin, imipenem, gentamycin, and ampicillin-sulbactam were observed. On the other hand, our results demonstrated nine genotype groups among *A. baumannii* strains based on REP-PCR method.

***Conclusion*:** Due to the high prevalence of antibiotic resistance among isolated *A. baumannii* strains, similarities between different genotypes and the dispersion of these genotypes in different parts of Shahrekord hospitals, the implementation of infection control programs in different parts of the hospital is necessary.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; Antibiotic Resistance; Genotyping; REP-PCR

# تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژنوتایپینگ سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد به روش REP-PCR

***عاطفه صرافان صادقی[۱]، نجمه انصاری[۲]، فرزاد خادمی[۳]، رضا میرنژاد[٤]، بهنام زمان زاد[۵]****

۱. گروه علوم تغذیه، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان، مشهد، ایران

۲. بیمارستان امام حسین (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

٤. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله (ع)، تهران، ایران

۵. گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۳۵۶۵۳ فاکس: ۰۳۸۳۳۳٤۹۱۱۳ پست الکترونیک: behnamzamanzad5@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** در سال‌های اخیر نشان داده شده است که *اسینتو باکتر بومانی* یکی از عوامل ایجادکننده عفونت بیمارستانی شامل پنومونی، باکترمی، عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های زخم و مننژیت می‌باشد. این میکروارگانیسم می‌تواند در محیط بیمارستان زنده بماند و به سرعت به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می شود. ژنوتایپ مولکولی می تواند اطلاعات ما را در مورد گسترش سویه های *اسینتو باکتر بومانی* از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر و همچنین مقاومت دارویی آنها افزایش دهد. هدف از این مطالعه تعیین شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز روابط فیلوژنیک سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد بود.

**روش کار:** در این مطالعه، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های بالینی مختلف (ادرار، خون و خلط) نسبت به سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین، نوروفلوکساسین، سفتازیدیم، جنتامیسین، آمیکاسین، ایمی پنم، مروپنم، سفی پیم، پایپریسیلین- تازوباکتام، آمپی سیلین- سولباکتام، توبرامایسین و آزترونام با روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) اندازه گیری شد. در نهایت ژنوتیپ سویه های *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از روش REP-PCR بررسی شد.

**یافته ها**: در این مطالعه، ۵۰ نمونه از بیماران به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی شدند که میزان مقاومت به دارو در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام سویه ها به سفتازیدیم و سفپیم مقاوم بودند و همچنین میزان بالای مقاومت به آزترونام، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، ایمی پنم، جنتامایسین و آمپی سیلین- سولباکتام مشاهده شد. از سوی دیگر، نتایج مطالعه حاضر نه گروه ژنوتیپ در میان گونه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بر اساس روش REP-PCR را نشان داد.

**نتیجه گیری**: با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جدا شده *اسینتو باکتر بومانی* و همچنین شباهت ژنوتیپ های مختلف و پراکنش این ژنوتیپ ها در بخش های مختلف بیمارستان های شهرکرد، اجرای برنامه های کنترل عفونت در بخش های مختلف بیمارستان لازم است.

**واژه های کلیدی:** *اسینتوباکتر بومانی*، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژنوتایپینگ، REP-PCR

**دریافت:** ۱۳۹۷/۰۹/۳۰ **پذیرش:** ۱۳۹۷/۱۲/۲۰

**مقدمه**

امروزه افزایش عفونت‌های باکتریایی مقاوم به دارو که مقارن با کاهش اثربخشی آنتی بیوتیک‌ها و گسترش باکتری‌های مقاوم به چند دارو می‌باشد، بر کسی پوشیده نیست. این بحران جهانی در اثر مصرف بی‌رویه و ناصحیح آنتی بیوتیک‌ها و گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های مختلف، روز به روز تشدید می‌گردد که اثرات جبران ناپذیری بر سلامت بشر می‌گذارد [۱،۲].

جنس اسینتوباکتر از جمله پاتوژن‌های فرصت طلب بوده که از آب، خاک، سطح پوست انسان، غذا و فاضلاب جدا شده و به صورت باسیل یا کوکوباسیل دیده می‌شوند [۳]. این ارگانیسم‌ها به عنوان فلور طبیعی در مجاری دهانی- حلقی افراد سالم وجود داشته و در سال‌های اخیر به عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده‌اند [٤]. اسینتوباکترها می‌توانند منابع گوناگونی از کربن را برای رشد خود استفاده کنند و بر روی محیط‌های نسبتا ساده رشد می‌کنند. آنها در رنگ‌آمیزی گرم مشابه نایسریاها هستند با این تفاوت که نایسریاها اکسیداز مثبت ولی اسینتوباکترها اکسیداز منفی می‌باشند [۳, ۵]. این باکتری‌ها می‌توانند طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل پنومونی اکتسابی از بیمارستان، عفونت خون، عفونت پوست و بافت‌های نرم آسیب دیده، عفونت ادراری، مننژیت، اندوکاردیت و التهاب صفاق را ایجاد نمایند [۶]. همچنین در یکی از مطالعات انجام شده، اسینتوباکتر به عنوان مهم‌ترین پاتوژن در ایجاد سپتی سمی‌های نوزادی در بیمارستان گزارش شده است [۷]. شایع‌ترین گونه‌ی این جنس، *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشد که اغلب به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بوده و الگوی مقاومت به چند دارو را در آزمایشات حساسیت دارویی از خود نشان می‌دهد [۸].

شناخت اصول اپیدمیولوژی جمعیت‌های میکروبی در میکروب‌شناسی پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. آگاهی از افزایش سویه‌های مختلف باکتری‌های بیماریزا، روش‌های جدید انتقال ارگانیسم‌ها و توسعه مقاومت آنها به آنتی بیوتیک‌ها از جمله عوامل مهمی در جهت شناسایی و کنترل منشا عفونت‌ها و نحوه انتشار سویه‌های یک گونه می‌باشند [۹]. برای مشخص نمودن سویه‌های شایع در سطح جامعه بایستی نمونه‌های ایزوله شده با روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین تیپ گردند. از آنجائیکه روش‌های سنتی می‌توانند تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرند و در نتیجه از کارایی پایینی برخوردارند، بنابراین امروزه بیشتر از روش‌های ژنتیکی استفاده می‌شود. روش‌های ژنتیکی مثل تکنیک REP-PCR[1] از ابزارهای مهمی جهت تایپ‌بندی گونه‌های مختلف میکروبی می‌باشند [۹, ۱۰]. روش REP-PCR به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تاکسونومی، ژنوتایپینگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر بوده و حتی در تمایز سوش‌های باکتریایی یک گونه نیز مطرح می‌باشد [۱۱]. این تکنیک به عنوان یک روش ارزشمند جهت شناسایی و تایپینگ باکتری‌های مختلفی از جمله لاکتوباسیل‌ها، ژئوباسیل‌ها و انتروکوک‌ها به کار رفته است [۱۲, ۱۳]. از مزایای این روش می‌توان به سهولت انجام روش، سرعت کار و قابلیت اجرا در تمامی آزمایشگاه‌ها اشاره کرد [۱۰].

از آنجائیکه در سالیان اخیر میزان اسینتوباکترهای جداشده از نمونه‌های عفونی در بیمارستان‌ها رو به افزایش بوده است، ژنوتایپینگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی می‌تواند اطلاعات ما را در راستای شناسایی اصول اپیدمیولوژی انتشار این باکتری افزایش دهد. بنابراین، این طرح با هدف بررسی میزان شیوع، مقاومت دارویی و ژنوتایپینگ سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد با روش آنتی بیوگرام و REP-PCR به اجرا درآمد.

[1] Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Based -PCR

## روش کار

### جداسازی و شناسایی *اسینتوباکتر بومانی*

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، در طی مدت ۶ ماه، تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی شامل نمونه‌های خون، ادرار، ترشحات تنفسی، تراشه و زخم از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های‌هاجر و کاشانی شهرکرد جمع آوری گردید. نمونه‌ها از بیمارانی که حداقل به مدت سه روز در بیمارستان بستری شده بودند جمع آوری شدند. از این تعداد نمونه، ۵۰ باکتری با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رنگ آمیزی گرم، واکنش روی محیط TSI، تست‌های اکسیداز، سیترات، حرکت، اندول، رشد در دمای ٤٤ درجه سانتی گراد و اکسیداسیون گلوکز در محیط OF به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی و جداسازی شدند.

### تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی*

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* شناسایی شده به آنتی بیوتیک‌های مختلف با روش انتشار دیسک در آگار[1] بر روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت MERCK، آلمان) و بر طبق پروتکل CLSI[2] مورد بررسی قرار گرفت [١٤]. آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی در این مطالعه به شرح زیر می‌باشند: سفتازیدیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (µg ۱۰)، پیپراسیلین-تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، ایمیپنم (۱۰ µg)، سولباکتام-آمپی سیلین(µg ۱۰/۱۰)، آمیکاسین (۳۰ µg)، توبرامایسین (۱۰ µg)، آزترونام (۳۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، سفپیم(۳۰ µg)، افلوکساسین (۵ µg) و نورفلوکساسین (۱۰ µg) (MAST، انگلستان).

### ژنوتایپینگ سویه‌های *اسینتو باکتر بومانی*

در این مطالعه، روش REP-PCR برای ژنوتایپینگ سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شد. برای این منظور سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* را در محیط TSA کشت داده و از کلنی‌های خالص بدست آمده برای استخراج ژنوم باکتری از طریق جوشاندن استفاده شد. از پرایمرهای (REP1) IIIGCGCCGICATCAGGC و (REP2) ACGTCTTATCAGGCCTAC در روش REP-PCR استفاده شد [۱۵]. واکنش REP-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. بدین ترتیب که ۱/۲ میکرولیتر از دو پرایمر (F و R)، ۲/۵ میکرولیتر ژنوم تخلیص شده باکتری، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیوم ($MgCl_2$)، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم G Taq polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر را مخلوط کرده و با استفاده از ۱۵/۶ میکرولیتر آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. چرخه دمایی REP-PCR بدین ترتیب تنظیم گردید: یک سیکل ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی تکراری با دمای ۹۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ٤٥ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۶۸ درجه سلیسیوس به مدت ۸ دقیقه و یک سیکل انتهایی با دمای ۶۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱۶ دقیقه. در مرحله بعدی از قدرت تفکیک بالای ژل پلی اکریل آمید[3] (PAGE) (۸ درصد) برای بررسی محصولات REP-PCR استفاده گردید.

### تجزیه و تحلیل داده ها

جهت ترسیم دندروگرام (درخت فیلوژنتیکی) انواع ژنوتایپ‌های گونه‌های باکتریایی *اسینتوباکتر بومانی* بر اساس الگوی باندها طی برش آنزیمی در الکتروفورز به صورت صفر و یک (وجود یا عدم وجود باند) برای داده‌ها امتیازدهی شد. در مرحله‌ی بعد بر اساس ماتریس مذکور، ماتریس فاصله را بر اساس الگوریتم Dice استخراج شد و سپس بر طبق ماتریس فاصله‌ی ایجاد شده دندروگرام مربوطه رسم گردید. در ترسیم دندروگرام از روش خوشه بندی مبتنی بر فاصله UPGMA[4] استفاده شد.

---

[1] Kirby-Bauer
[2] Clinical and Laboratory Standards Institute
[3] Polyacrylamide Gel Electrophoresis
[4] Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

## یافته‌ها

در بررسی به عمل آمده، از بین ۵۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی*، تعداد (۳۸٪) ۱۹ نمونه از خون، (۳۰٪) ۱۵ نمونه از تراشه، (۱۸٪) ۹ نمونه از زخم، (۸٪) ٤ نمونه از ادرار و (۶٪) ۳ نمونه از دهان بدست آمدند. نتایج آنتی بیوگرام بر اساس دو ویژگی مقاوم (R) و حساس (S) مشخص شدند. بر این اساس، حساسیت کلی ایزوله‌ها به هر آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱. الگوهای مقاومت دارویی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از نمونه‌های بالینی**

| آنتی بیوتیک | **تعداد** | مقاومت (٪) |
|---|---|---|
| سفپیم | ۵۰ | ۱۰۰ |
| سفتازیدیم | ۵۰ | ۱۰۰ |
| آزترونام | ٤۹ | ۹۸ |
| نورفلوکساسین | ٤۸ | ۹۶ |
| اوفلوکساسین | ٤۶ | ۹۲ |
| سیپروفلوکساسین | ٤۶ | ۹۲ |
| آمیکاسین | ٤۵ | ۹۰ |
| ایمیپنم | ۳۹ | ۷۸ |
| جنتامایسین | ۳۲ | ۶٤ |
| آمپی سیلین-سولباکتام | ۳۱ | ۶۲ |
| پیپراسیلین-تازوباکتام | ۲٤ | ٤۸ |
| مروپنم | ۲۲ | ٤٤ |
| توبرامایسین | ۱٤ | ۲۸ |

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بالاترین میزان مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* به آنتی بیوتیک‌های سفپیم و سفتازیدیم و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های توبرامایسین و مروپنم مشاهده گردید. طبق جدول ۲، مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) در *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تمام ایزوله‌ها دارای مقاومت چند گانه بودند.

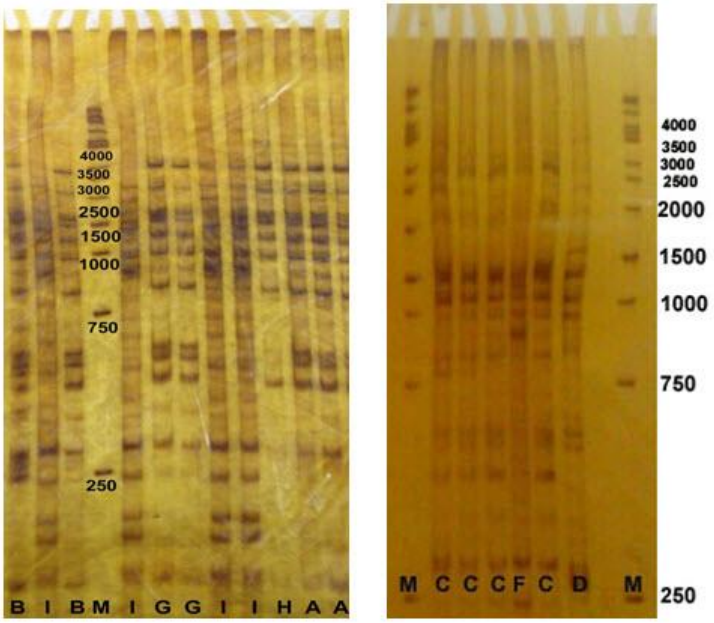
ژنوتایپینگ ۵۰ ایزوله‌ی *اسینتوباکتر بومانی* بدست آمده از نمونه‌های مختلف با روش REP-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در تعیین گروه‌های ژنوتایپینگ، طول قطعات و تعداد آنها (تفاوت بیش از دو باند) مقایسه شدند. تعداد باندهای به دست آمده بین ۹ تا ۱۵ باند بودند. پس از به دست آوردن الگوهای سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*، ضریب تشابه (درصد شباهت) آن‌ها با استفاده از ضریب جاکارد به دست آمد. بر طبق آن، هرچه ضرایب تشابه سویه‌ها به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، سویه‌ها ارتباط نزدیک‌تری دارند و هرچه ضرایب تشابه به صفر نزدیک‌تر باشد، سویه‌ها ارتباط کمتری باهم دارند. به این ترتیب ۹ الگو بدست آمد. با توجه به بررسی الگوها، ۳۶ درصد نمونه‌ها در گروه A، ٤ درصد در گروه B، ۸ درصد در گروه C، ۲ درصد در گروه D، ۱۰ درصد در گروه E، ۲ درصد در گروه F، ۸ درصد در گروه G، ۲۰ درصد در گروه H و ۱۰ درصد در گروه I قرار گرفتند. اندازه قطعات بدست آمده بین ۰/۲-٤ kb می‌باشد. جدول ۳، پراکندگی الگوهای ژنوتایپینگ بدست آمده نشان داده شده است و همچنین شکل ۱، الگوی ژنوتایپ‌های (A-I) را مشخص کرده است.

**جدول ۲. مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی***

| تعداد آنتی‌بیوتیک | تعداد نمونه‌های مقاوم به یک یا چند آنتی‌بیوتیک | جمع |
|---|---|---|
| ۱ | ۷ | |
| ۲ | ۱۶ | |
| ۳ | ۱۳ | ۵۰ |
| ٤ | ۵ | |
| >٤ | ۹ | |

**جدول۳. پراکندگی الگوهای ژنوتایپینگ به دست آمده از ۵۰ نمونه *اسینتوباکتر بومانی***

| تعداد باند در هر الگو | تعداد بیماران | الگوی ژنوتایپینگ |
|---|---|---|
| ۱۵ | ۱۸ | A |
| ۱۵ | ۲ | B |
| ۱۲ | ٤ | C |
| ۱۱ | ۱ | D |
| ۸ | ۵ | E |
| ۹ | ۱ | F |
| ۱٤ | ٤ | G |
| ۱۱ | ۱۰ | H |
| ۱٤ | ۵ | I |
| ۹۲ | ۵۰ | جمع |

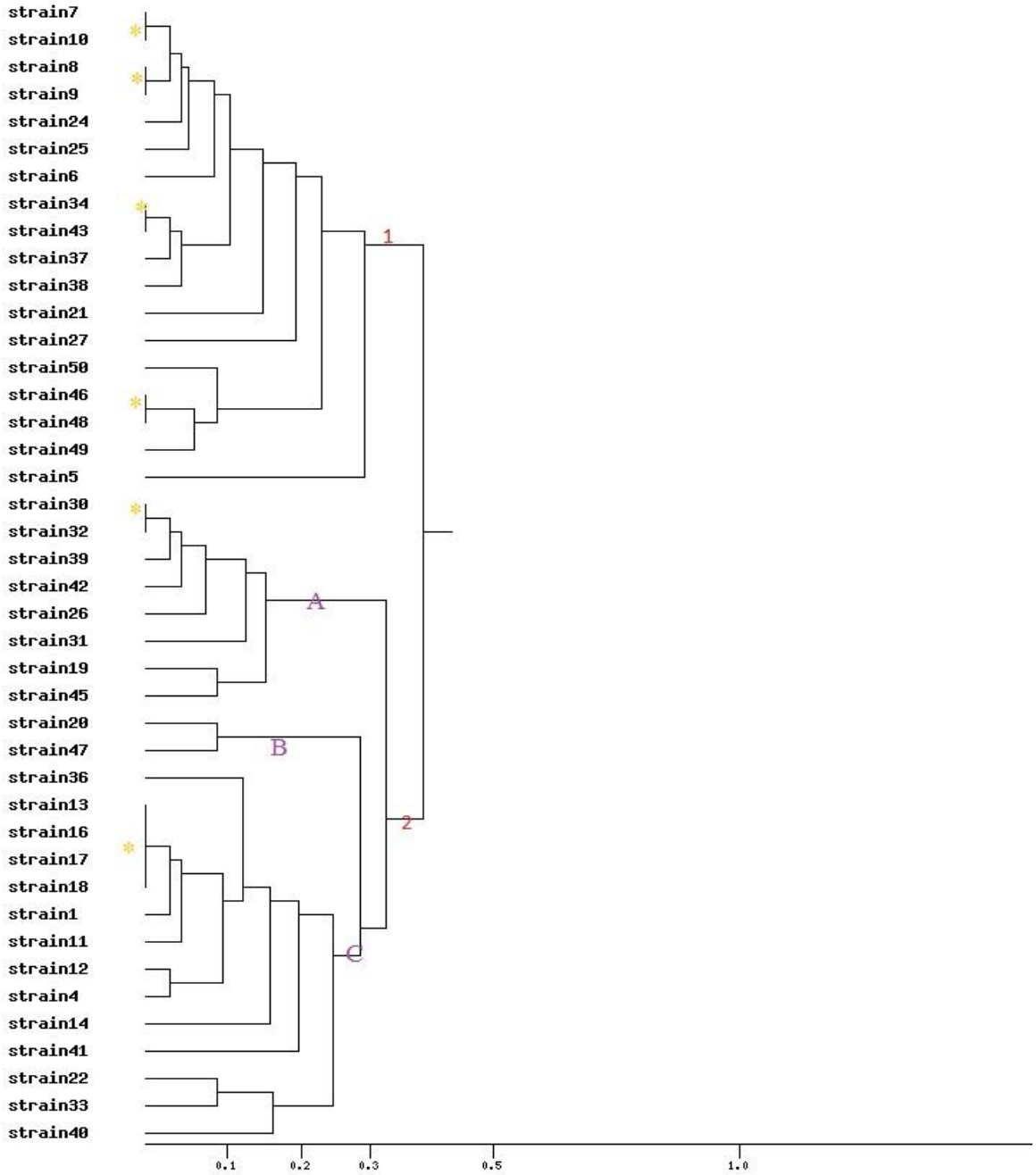



**شکل ۱. الگوهای ژنوتایپینگ A-I سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بدست آمده از نمونه‌های کلینیکی بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪. ستون M: مارکر 1kb**

با بررسی الگوهای بدست آمده از نمونه‌های بخش ICU مشاهده شد که ۲۲ درصد نمونه‌ها (۱۱ نمونه) از این بخش جدا شده‌اند که ۶۳/۶ درصد نمونه‌ها (۷ نمونه) در ژتوتایپ H، ۱۸/۲ درصد نمونه‌ها (۲ نمونه) در ژنوتایپ I و ۱۸/۲ درصد (۲ نمونه) در ژنوتایپ G قرار داشتند. بقیه نمونه‌ها از دیگر بخش‌ها جداسازی شدند.

در بررسی درخت فیلوژنتیکی، انواع ژنوتایپ‌ها را می‌توان به دو گروه[1] اصلی تقسیم نمود. می‌توان اظهار نمود که سویه‌هایی که در سرشاخه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند شباهت زیادی به همدیگر دارند و حتی آنهایی که توسط یک خط عمود نشان داده شده‌اند کاملا شبیه همدیگرند. هرچه سرشاخه‌ها از هم فاصله‌ی بیشتری داشته باشند دو گونه یا گونه‌های مورد مقایسه خویشاوندی کمتری با هم داشته و شباهت توالی ژن در آنها کمتر است و زمان انشقاق آنها به زمان دورتری بر می‌گردد. با بررسی چشمی تصاویر ژل الکتروفورز و نیز نتایج دندروگرام (شکل ۲) مربوط به ژنوتایپ‌های *اسینتوباکتر بومانی* موید این مطلب است که سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بدست آمده در بخش‌های مختلف بیمارستان نیای شترکی دارند و همه از یک گونه مشتق شده اند.

[1] Clade




**شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی مربوط به نمونه‌های *اسینتوباکتر بومانی*. دندروگرام نشان‌دهنده تقسیم‌بندی کلیه سویه‌ها به دو گروه اصلی است و همچنین شباهت زیاد سویه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد(دسته‌ها ۸۰٪ و کلون‌ها ۹۵٪ تشابه دارند). خطوط عمود که با ستاره مشخص شده‌اند سویه‌های کاملا شبیه را در هر گروه مشخص می‌کند. خط افقی زیر تصویر درصد تشابه را نشان می‌دهد.**

## بحث

عفونت‌های بیمارستانی به دنبال جراحی، ضعف سیستم ایمنی افراد و جراحات در بیمارستان‌ها احتمال عفونت‌های ثانویه با باکتری‌های بیماریزای فرصت طلب را افزایش می‌دهند. بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌ها به علت وخیم بودن حال بیماران بستری در آن بیشتر در معرض خطر می‌باشند. اسینتوباکترها گروهی از پاتوژن‌های بیماریزای فرصت طلب در بیمارستان‌ها را تشکیل می‌دهند که تعداد موارد بیماریزایی آنها روز به روز در حال افزایش است.

بنابراین درمان آنتی بیوتیکی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. با وجود ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی، کارباپنم‌ها هنوز به عنوان پایه اصلی در درمان عفونت‌های اسینتوباکترهای مقاوم به درمان به کار می‌روند [۱۶]. با این حال، نتایج ما شیوع بالایی از مقاومت به کارباپنم‌ها، ایمیپنم ۷۸ درصد و مروپنم ٤٤ درصد را نشان می‌دهد (جدول ۱). سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی از سرتاسر دنیا گزارش شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اکثر ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* دارای مقاومت چند گانه هستند. مطالعه ای که در اصفهان انجام شد، ۸۵ درصد نمونه‌ها مقاومت چند دارویی را نشان می‌دادند [۱۷]. هم چنین دو مطالعه دیگر در هند و ایران نشان دادند که ۷۵ درصد ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* دارای مقاومت چند گانه بودند [۱۸،۱۹]. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط آیان[1] و همکاران انجام شد، از ۵۲ سویه مورد مطالعه، همه ایزوله‌ها به پیپراسیلین، پیپراسیلین- تازوباکتام، تیکارسیلین- کلاولانیک اسید، سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، جنتامیسین و آزترونام مقاوم بودند و مقاومت به توبرامایسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین- سولباکتام، کوتریموکسازول و آمیکاسین به ترتیب در ۵، ۸، ۵۵، ۶۶ و ۷٤ درصد باکتری‌ها مشاهده گردید [۲۰]. همچنین مطالعات انجام شده در دیگر نقاط جهان نشان می‌دهد که شیوع سویه‌های مقاوم بیمارستانی اسینتوباکتر حتی در کشورهای توسعه یافته هم رو به رشد می‌باشد. مطالعه‌ای در امریکا میزان مقاومت سویه‌های اسینتوباکتر به ایمیپنم را ۲۹ درصد و از طرفی ٤۱ درصد ایزوله‌ها را به آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها و کینولون‌ها مقاوم گزارش کرده است [۲۱]. همچنین در مطالعه انجام شده در ماداگاسکار روی ایزوله‌های اسینتوباکتر، میزان مقاومت به توبرامایسین ۳۳ درصد و آمیکاسین ۵۳ درصد گزارش شده است [۲۲].

روش REP-PCR مبتنی بر استفاده از پرایمرهایی می‌باشد که به کمک آن‌ها توالی‌های تکراری حفاظت شده در ژنوم باکتری را تکثیر می‌دهند. در این مطالعه الگوی ژنومی سویه‌های جداشده از انواع نمونه‌های بیمارستانی به روش REP-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است، بیشتر سویه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر دارای الگوی پلی مورفیک بودند که نشان دهنده سرعت بالای پلی مورفیسم در ژنوم این باکتری می‌باشد. در تفسیر نتایج حاصل از این روش، سویه‌هایی که دارای الگوی باند یکسانی باشند و تعداد و اندازه قطعات تکثیر شده DNA یکسان باشند، یک کلون محسوب می‌شوند. تعداد باندها از الگوهای بدست آمده بین ۹ تا ١٤ باند بودند. با بررسی تعداد باندهای بدست آمده و مقایسه آنها با یکدیگر ۹ الگوی متفاوت ژنی بدست آمد (A-I) (شکل ۱ و ۲). بررسی الگوهای بدست آمده از دندروگرام نشان‌دهنده شباهت زیاد سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بدست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد می‌باشد. دو گروه مشخص شده در دندروگرام، ۷۰ درصد تشابه داشتند. مقایسه نتایج گروه‌بندی چشمی و دندروگرام نتایج تقریبا مشابهی را نشان می‌دهد. تشابه زیاد سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* بین بیمارستان‌های شهرکرد نشان‌دهنده احتمال انتشار این سویه‌ها از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر به وسیله پزشکان، پرسنل بیمارستان، تجهیزات پزشکی و یا عوامل دیگر باشد. در تحقیقی در ماداگاسکار بر روی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو، سویه‌های مقاوم به کارباپنم در پنج ژنوتایپ مختلف گروه بندی شدند. ژنوتایپ A با بیشترین فراوانی در دو بیمارستان شناسایی شد ولی ژنوتایپ B فقط در یک بیمارستان وجود داشت. آنها به این نتیجه رسیدند که سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

[1] Ayan

در گروه A بین این دو بیمارستان انتشار یافته اند [۲۲]. اسکات[1] و همکاران ۳۰ ایزوله از *اسینتوباکتر بومانی* را شناسایی کردند و به روش REP-PCR به هفت ژنوتایپ مختلف تقسیم بندی کردند [۲۳]. اندازه باندهای این الگوها شبیه مطالعه حاضر ولی تعداد باندهای آن کمتر بود که احتمالا به این دلیل است که در این مطالعه از ژل اکریل آمید استفاده شده که قدرت تمایز بالاتری دارد. در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۹ در چین انجام شد، ٤۹ ایزوله از *اسینتوباکتر بومانی* را مورد بررسی قرار دادند و سپس به روش REP-PCR نه گروه ژنی (A-I) را شناسایی کردند. ۲۷ ایزوله در گروه A، ۸ ایزوله در گروه B، ٤ ایزوله در گروه C و ۳ ایزوله در هر یک از گروه‌های D و E قرار داشتند. در هر یک از گروه‌های H, G, F و I تنها یک ایزوله قرار داشت. گروه‌های A و B در سه بیمارستان در شهرهای مختلف پراکنده شده بودند، گروه D از دو بیمارستان در یک شهر و دو گروه دیگر تنها در یک بیمارستان شناسایی شدند. این نتایج نشان می‌دهد که ایزوله‌های اسینتوباکتر بین بیمارستان‌های مختلف پراکنده شده‌اند [٢٤]. نتایج این بررسی با مطالعه حاضر تطابق دارد. در مطالعه مصباح و همکارانش در مالزی، ۱۰۹ ایزوله از *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیر REP-PCR تقریباً ۵ تا ۱۱ باند در اندازه‌های ۰/۲-۳k در هر الگو مشاهده شد و ۹ ژنوتایپ بدست آمد که با تحقیق حاضر تطابق دارد. تمام ژنوتایپ‌های اسینتوباکتر در این تحقیق به کاربپنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوئینون‌ها حساس بودند. بیشتر ایزوله‌ها در گروه ٤ و ۱ قرار داشتند. با بررسی الگوی ژنوتایپینگ و مقاومت دارویی به این نتیجه رسیدند که حذف ژنی یا وارد شدن یک ژن که می‌تواند در توالی‌های rep تاثیر داشته باشد در ایجاد مقاومت دارویی دخالتی ندارد. از طرف دیگر بقیه مکانیسم‌های موتاسیون ژنی و خاموشی ژن‌های دیگر می‌توانند در ارتباط با مقاومت دارویی در میان سویه‌های اسینتوباکتر باشد. در نتیجه در توالی‌های rep ناحیه‌ای که حاوی ژنوم مربوط به مقاومت دارویی باشد وجود ندارد [۲۵]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که موثرترین آنتی‌بیوتیک برای مقابله با عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* در مقایسه با داروهای ارزیابی شده دیگر توبرامایسین می‌باشد. با این وجود مقاومت باکتری به توبرامایسین هم بالا می‌باشد.

## نتیجه گیری

افزایش میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به دارو، بویژه سویه‌های مقاوم به چند دارو، لزوم طراحی برنامه‌های حفاظتی نظیر کنترل عفونت‌های ایجاد شده در بخش مراقبت‌های ویژه را خاطر نشان می‌کند. همچنین برای جلوگیری از گسترش بیشتر سویه‌های مقاوم به دارو، با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان این باکتری‌ها را شناسایی و ویژگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها را تعیین و متناسب با آن آنتی‌بیوتیک مناسب را تجویز نمود. بررسی الگوهای انگشت نگاری نشان‌دهنده وجود ژنوتایپ‌های مختلف و انتشار آن‌ها در بیمارستان‌های شهرکرد می‌باشد. با توجه به این که سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* در این مطالعه میزان بالایی از مقاومت دارویی را نشان دادند، عدم کنترل انتشار این باکتری‌های بیماریزای فرصت طلب می‌تواند مشکلات زیادی را در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری ایجاد کند. بنابراین، بررسی مداوم الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز الگوی انتشار این باکتری‌ها در بیمارستان‌های شهرکرد به همراه محدود کردن یا مصرف مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند راهکارهای مفیدی برای کنترل انتشار سویه‌های مقاوم به درمان و در نتیجه کنترل شکست درمان دارویی عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این میکروارگانیسم‌ها باشند.

[1] Scott

**تشکر و قدردانی**

این مقاله حاصل طرح پایان نامه مصوب با کد ۱۲۹ شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می‌باشد. نویسندگان از کلیه افرادی که در طول انجام این تحقیق یاری رسانده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

***References***

1- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharm. Ther. 2015 Apr;40(4):277-283

2- Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. Clin infect dis. 2014 Spt;59(suppl_2):S71-5.

3- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Int antimicrob agents. 2015un;45(6):568-85.

4- Kong BH, Hanifah YA, Yusof MYM, Thong KL. Antimicrobial susceptibility profiling and genomic diversity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital, Malaysia. JPN j infect dis. 2011;64(4):337-40.

5- Mohajeri P, Farahani A, Feizabadi M, Norozi B. Clonal evolution multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* by pulsed-field gel electrophoresis. Indian j med microbiol. 2015 Jan;33(1):87.

6- Zhao S-y, Jiang D-y, Xu P-c, Zhang Y-k, Shi H-f, Cao H-l, et al. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. Ann clin microbiol antimicrob. 2015 Dec;14(1):7.

7- Arora U, Jaitwani J. Acinetobacter spp. an emerging pathogen in neonatal septicemia in Amritsar. Indian j med microbiol. 2006 Jan;24(1):81.

8- Knezevic P, Aleksic V, Simin N, Svircev E, Petrovic A, Mimica-Dukic N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. J ethnopharmacol. 2016 Feb;178:125-36.

9- Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. J endodo. 2017 Mar;43(3):377-82.

10- Sorkh MAG, Shokoohizadeh L, Rashidi N, Tajbakhsh E. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by repetitive extragenic palindromic-PCR [rep-PCR]. Iran Red Crescent Med J. 2017;19(4).

11- Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins P, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the Magic Bullet clinical trial. J Antimicrob Chemother. 2017 Sep;72(12):3277-82.

12- Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. Food microbiol. 2010 Sep;27(6):731-40.

13- Švec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, et al. Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus spp*. FEMS Microbiol Lett. 2005 Jun;247(1):59-63.

14- Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.100-121.

15- Carvalho KR, Carvalho-Assef APDA, Peirano G, dos Santos LCG, Pereira MJF, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int j antimicrob agents. 2009 Jul;34(1):25-8.

16- Evans SR, Hujer AM, Jiang H, Hill CB, Hujer KM, Mediavilla JR, et al. Informing antibiotic treatment decisions: evaluating rapid molecular diagnostics to identify susceptibility and resistance to carbapenems against Acinetobacter spp. in PRIMERS III. J clin microbiol. 2017 Jan;55(1):134-44.
17- Karbasizade V HL. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from Intensive Care Units of Isfahan hospitals. J Isfahan Med Sci. 2012;191(30):759-63**.** [Full text in Persian]
18- Joshi SG, Litake GM, Niphadkar KB, Ghole VS. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital. J infect chemother. 2003 Jun;9(2):187-90.
19- Anvarinejad M, Japoni A, Davarpanah MA, Mahmudi H, Mammina C, Vazin A. Phenotypic and molecular epidemiology of acinetobacter calcoaceticus baumannii complex strains spread at nemazee hospital of Shiraz, Iran. Jundishapur j microbiol. 2015 Jun;8(6):e19180.
20- Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. J Hosp Infect. 2003 May;54(1):39-45.
21- Dent LL, Marshall DR, Pratap S, Hulette RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. BMC infect dis. 2010 Dec;10(1):196.
22- Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC, Randrianirina F, Ramparany L, Carod J-F, et al. Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. Ann clin microbiol antimicrob. 2010 Dec;9(1):17.
23- Weisenberg SA, Schuetz AN, Alexander EA, Eiss B, Behta M, Saiman L, et al. Endemic *Acinetobacter baumannii* in a New York hospital. PLoS One. 2011 Dec;6(12):e28566.
24- Yan Z-Q, Shen D-X, Cao J-R, Chen R, Wei X, Liu L-P, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. Int j antimicrob agents. 2010 Mar;35( 3):269-73.
25- Misbah S, AbuBakar S, Hassan H, Hanifah Y, Yusof M. Antibiotic susceptibility and REP-PCR fingerprints of *Acinetobacter spp*. isolated from a hospital ten years apart. J Hosp Infect. 2004 Dec;58(4):254-61.